

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500580

研究課題名(和文) グレリンのエネルギー同化作用による骨格筋代謝機能改善の可能性に関する研究

研究課題名(英文) A basic study on utilization of ghrelin-induced anabolic effect to improve skeletal muscle metabolism

研究代表者

十枝内 厚次(TOSHINAI KOJI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：80381101

研究成果の概要(和文): グレリンは、成長ホルモン分泌と摂食に機能する胃由来のペプチドホルモンである。グレリンの廃用性筋萎縮、メタボリックシンドローム、「寝たきり」改善効果について検証した。後肢懸垂による廃用性筋萎縮モデルマウスへのグレリン投与は、骨格筋のインスリンシグナルを増加させ、蛋白異化作用を持つ酵素発現を抑制した。この作用は、骨格筋への直接的な作用でなく、成長ホルモン分泌と摂食亢進作用が重要であることを明らかにした。本研究の結果は、グレリンの投与は廃用性筋萎縮を抑制し、エネルギー代謝がもたらす様々な疾患や傷害に有効である可能性を示した。

研究成果の概要(英文): Ghrelin, a peptide produced in the stomach, stimulates feeding and growth hormone secretion. I studied here whether ghrelin improved muscle atrophy, metabolic syndrome, and bedridden. Ghrelin treatment in mice exposed to hindlimb suspension-induced muscle atrophy increased insulin signal (anabolic function), and decreased expressions of atrophy-related E3 ubiquitin ligases (catabolic function). These anti-atrophic functions by ghrelin were indirectly effect in mice skeletal muscle. To exert ghrelin-induced anti-atrophic functions was necessary for increases of growth hormone secretion and food intake. Ghrelin treatment was effective for the prevention and improvement of muscle atrophy.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢、肥満が起因となって生じる活動量

の低下は、筋の代謝能力を低下させ、筋量の低下を伴って、将来的にメタボリックシンド

ロームや「寝たきり」を引き起こす。国民の健康増進の面からも、国民医療費の軽減の面からも、「寝たきり」の防止が求められている。

(2) グレリンは、胃から分泌されるペプチドホルモンで、成長ホルモン分泌と摂食に機能する。細胞の生存やアポトーシスの抑制等にも機能し、生体のエネルギー同化にシフトする役割を担っている。しかしながら、グレリンの骨格筋への作用は不明である。

2. 研究の目的

肥満が根底にあり、血糖値、血清脂質、血圧の各因子の内2つが境界域に至ると様々な疾患を誘発することからメタボリックシンドロームという新たな疾患概念が報告され、世界中で治療戦略が検討されている。肥満は、エネルギー摂取が、消費を上回るために起こる現象である。骨格筋のエネルギー代謝を維持・亢進させることは、一過性の運動中に生じるエネルギー消費のみならず、基礎代謝も亢進させ、肥満の予防・改善に直結する。グレリンは、摂食と成長ホルモン分泌を刺激し、エネルギー同化に機能している。運動中の骨格筋は、エネルギー異化亢進の状態にあり、エネルギー同化にはたらくグレリンが、細胞機能維持に重要な役割を担っているかもしれない。グレリンの骨格筋における役割を明確にすることは、骨格筋に対する運動の効果をより有効なものにすると同時に、高齢期の骨格筋量減少(サルコペニア)の抑制、生活の質(QOL)向上にもつながることから重要な検討課題である。本研究は、ラットおよびマウスを用いて、グレリンの骨格筋における生物学的役割とその作用機序を明らかにする。さらに骨格筋におけるエネルギー代謝改善に向けて、グレリンシステムを利用した新たな介入法の確立に向け、評価法も含めた研究基盤を作製する。

3. 研究の方法

本研究では廃用性筋萎縮の動物実験モデルである後肢懸垂を用い、グレリン投与が廃用性筋萎縮に与える影響について検討した。また、グレリン投与が萎縮した骨格筋における蛋白合成・分解系の責任分子に与える影響も合わせて解析した。

(1) C57/BL6 マウスに後肢懸垂を2週間負荷し、廃用性筋萎縮を誘発した。後肢懸垂中に、グレリン(107nmol/kg体重)を1日2回2週間投与し、グレリンが廃用性筋萎縮を抑制する可能性を検討した。

(2) 後肢懸垂が終了して骨格筋が萎縮してからグレリンを5日間投与し、グレリンが廃用性筋萎縮からの回復を促進する可能性を

検討した。グレリン投与は摂食量を増大させることが予想されるため、グレリン投与群と非投与群の摂食量を等しく設定した pair-feeding の実験も行った。

(3) グレリンを投与し、萎縮した骨格筋内のAkt(蛋白合成系)、STAT5(蛋白合成系)の活性化をウェスタンブロッティング法にて、IGF-1 遺伝子(蛋白合成系)と atrogen-1 遺伝子(蛋白分解系)発現の定量を RT-PCR 法にて測定した。

(4) グレリンを投与し、迷走神経の電気活動を解析するとともに、GLP-1の前投与によるグレリンの摂食亢進作用を測定した。また神経の活性化の指標である Fos 蛋白の発現を、延髄の孤束核と迷走神経節において免疫染色で評価した。

(5) 中枢における摂食調節シグナルにおけるグレリンシステムと新規ペプチド NERP-2との関係を比較検討するため、NERP-2の摂食調節機序とその下流を行動薬理的、免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 2週間の後肢懸垂は、体重や内臓脂肪量を減少させ、後肢骨格筋に顕著な廃用性筋萎縮を惹起した。後肢懸垂中にグレリンを投与していくと、体重や内臓脂肪量に変化はなかったが、筋萎縮は一部抑制された。

(2) 2週間の後肢懸垂後からグレリンを投与していくと、後肢懸垂により減少していた体重と内臓脂肪量は速やかに増加し、筋萎縮からの回復は促進した。グレリン投与は摂食量を増大したが、グレリンによる抗筋萎縮作用は pair-feeding 条件下においても確認された。

(3) 後肢懸垂によって萎縮した骨格筋では、Akt 活性と IGF-1 遺伝子発現の低下、および atrogen-1 遺伝子発現の増加が確認された。グレリンを投与すると、血漿成長ホルモン濃度は一時的に安静時の20倍にまで上昇し、IGF-1の転写因子であるSTAT5を急性に活性化した。この活性化は2時間後にIGF-1遺伝子発現を増加させた。Aktの活性化と atrogen-1の遺伝子発現にグレリン投与の影響は認められなかった。

(4) グレリンの骨格筋肥大作用は、筋への直接的な作用は無い可能性がある。グレリンの抗筋萎縮作用は、GH-IGF-1作用を介し蛋白同化を亢進させ、摂食による基質摂取の亢進と一体となって発揮されると考えられる。グレリン投与の繰り返しは、成長ホルモン分泌を

徐々に低下させるが、摂食亢進作用には影響しない。従って、廃用性筋萎縮におけるグレリンの有効性は、グレリンの摂食亢進作用を活用することが望ましい。そこで、グレリンの摂食作用について、末梢および中枢について検討を試みた。グレリンの摂食作用は、末梢において摂食抑制に機能する GLP-1 投与の後、30分間は機能しないことが明らかとなった。中枢では、申請者らが発見した摂食亢進に機能する。また中枢性にグレリンは、脂肪嗜好性になることから、投与の用量とタイミングには注意の必要性が示唆された。

(5) NERP-2 はオレキシン神経からのオレキシン放出を促進することにより機能する摂食亢進ペプチドである。グレリンもオレキシンとニューロペプチド Y システムを活性化することにより摂食を亢進することから、この両者は、システムを共存していることが明らかとなった。

本研究により、グレリン投与は後肢懸垂による筋萎縮を抑制し、筋萎縮からの回復を促進させる抗筋萎縮作用を有していることがわかった。また、その作用機序としては、グレリンが萎縮した骨格筋の GH シグナル (STAT5 の活性化と IGF-1 遺伝子発現の増加) を活性化させることが重要である可能性が示唆された。また、これらの作用には、摂食を伴った基質の摂取が不可欠であり、グレリンの利点の一つとなると考えられる。これらの結果は、グレリンが、廃用性の骨格筋萎縮の治療法になりうる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Shiyya T, Ueno H, Toshinai K, Kawagoe T, Naito S, Tobina T, Nishida Y, Shindo M, Kangawa K, Tanaka H, Nakazato M, Significant lowering of plasma ghrelin but not des-acyl ghrelin in response to acute exercise in men. *Endocr J*, 査読あり、in press

Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M, Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 査読あり、229 巻、2010、E394-E401

Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Kangawa K, Shimada K, Kario K, Nakazato M. Plasma des-acyl ghrelin,

but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis*, 査読あり、204 巻、2009、590-594

Toshinai K, Nakazato M, Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2: novel bioactive peptides processed from VGF. *Cell Mol Life Sci*, 査読あり、66 巻、2009、1939-1945

十枝内厚次, 胃由来のホルモンと運動。 *体育の科学*, 査読なし、59 巻、2009、554-559

中里雅光, 越中敬一, 十枝内厚次, 児玉剛士, 芦谷淳一, 加齢性サルコペニアのメカニズムとグレリンによる治療介入の可能性. *日本老年医学会雑誌*, 査読なし、46 巻、2009、330-331

[学会発表](計12件)

Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M (2010) A novel hypothalamic peptide, neuroendocrine regulatory peptide-2, regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, 2010.12.5.

十枝内厚次, 山口秀樹, 影山晴秋, 松尾崇, 越中敬一, 佐々木一樹, 塩田清二, 南野直人, 中里雅光 (2010) NERP-2 のオレキシン発現調節の解析. 神経内分泌学会第37回学術集会, 京都, 2010.10.22.

十枝内厚次, 野間健之, 水田雅也, 中里雅光 (2010) テルミサルタンのエネルギー代謝調節作用における視床下部の役割. 第31回日本肥満学会, 前橋, 2010.10.2.

越中敬一, 十枝内厚次 (2010), グレリンの慢性投与が骨格筋のインスリン作用に与える影響. 第65回日本体力医学会大会, 市川, 2010.9.17.

Koahinaka K, Toshinai K, Yamaguchi H, Nakazato M (2010), GHS-R is involved in insulin action in mouse skeletal muscle. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2010.3.30.

Koahinaka K, Toshinai K, Oshikawa M, Nakazato M (2009), Ghrelin prevents mechanical unloading-induced muscle atrophy in mice. 2009 International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Japan,

2009.11.18.

十枝内厚次、越中敬一、塩田清二 (2009) エネルギー代謝調節に機能する新規神経ペプチドの発見, 新潟, 第64回日本体力医学会大会, 2009.9.19.

越中敬一, 十枝内厚次 (2009), エネルギー代謝におけるグレリン受容体の役割. 第64回日本体力医学会大会, 新潟, 2009.9.19.

十枝内厚次, 山口秀樹, 影山晴秋, 松尾崇, 越中敬一, 佐々木一樹, 塩田清二, 南野直人, 中里雅光 (2009) 摂食調節に機能する神経細胞由来ペプチドの発見, 北九州, 2009.9.4.

越中敬一, 十枝内厚次 (2009), グレリンは廃用性筋萎縮を抑制・改善する. 第17回日本運動生理学会大会, 東京, 2009.7.25.

十枝内厚次, 越中敬一, 飛奈卓郎, 西田裕一郎, 内藤聖子, 進藤宗洋, 田中宏暁 (2008) 一過性長時間運動中の血漿グレリンレベルの変動. 第63回日本体力医学会大会, 別府, 2008.9.18.

越中敬一, 十枝内厚次 (2008), 廃用性骨格筋萎縮に対するグレリン投与の影響. 第63回日本体力医学会大会, 別府, 2008.9.18.

〔図書〕(計2件)

佐々木一樹、十枝内厚次、中里雅光、南野直人、羊土社、代謝・内分泌 ネットワークと医薬応用「セクレトペプチドーム解析で発見された新しい摂食調節ペプチドNERP-2」, 2011、98-103

十枝内厚次、有限会社ナップ、運動と免疫 「運動と胸腺と免疫」, 「運動と脾臓と免疫」, 2009、62-65

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページの開設準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

十枝内 厚次 (TOSHINAI KOJI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：80381101

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：